

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Asal Rizosfer Tanaman Mimba

Isolation and Characterization of Nitrogen-fixing Bacteria from the Rhizosphere of Neem Plants

Warida Hafni¹⁾, Yusminah Hala²⁾ dan Hartono³⁾

¹⁾Mahasiswa Prodi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, Makassar

²⁾Dosen Prodi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, Makassar

³⁾Dosen Prodi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, Makassar

Email : waridhafni@gmail.com, yushala@unm.ac.id, hartono@unm.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi bakteri asal rizosfer tanaman mimba. Jenis penelitian ini merupakan penelitian Deskriptif untuk mengetahui penambatan nitrogen bakteri yang diisolasi dari rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Penelitian ini dimulai dengan mengisolasi sampel, purifikasi, penentuan bakteri penambat nitrogen, karakterisasi isolat bakteri, dan pengujian hormon AIA dengan menggunakan metode spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat lima isolat bakteri penambat nitrogen yang berhasil diisolasi ditumbuhkan pada medium NfB (Nitrogen Free Bromthymol Blue). Isolat *Azospirillum*, *Azotobacter* dan *Actinomycetes* yang diperoleh kemudian dikarakterisasi secara morfologi menunjukkan perbedaan warna koloni yaitu warna putih bening, putih kekuningan dan putih susu. Jenis bakteri yang didapatkan didominasi bakteri gram negatif dan satu isolate bakteri gram positif. Karakterisasi biokimia menunjukkan adanya perbedaan penggunaan citrat dan motilitas. Pengujian hormon AIA telah didapatkan yang memiliki kemampuan tertinggi yaitu 15.15, 15.11, 14,64, 14.42 dan 14.01 ppm oleh isolat dengan kode RMB7, RMB4, RMB1, RMA1 dan RMA2.

Kata Kunci : bakteri penambat nitrogen, rizosfer, hormon AIA

ABSTRACT

This study aims to determine the characterization of bacteria from neem plant rhizosphere. This type of research is descriptive research to determine the nitrogen fixation of bacteria isolated from the rhizosphere of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) plants. This research was started by isolating the sample, purification, determination of nitrogen-fixing bacteria, characterization of bacterial isolates, and testing of AIA hormone using spectrophotometric methods. The results showed that there were five isolates of nitrogen fixing bacteria that were successfully isolated grown on NfB (Nitrogen Free Bromthymol Blue) medium. The isolates of *Azospirillum*, *Azotobacter* and *Actinomycetes* obtained were then characterized morphologically showing differences in colony color, namely clear white, yellowish white and milky white. The type of bacteria obtained was dominated by

gram-negative bacteria and one isolate of gram-positive bacteria. Biochemical characterization showed differences in the use of citrate and motility. AIA hormone testing has been obtained which has the highest ability, namely 15.15, 15.11, 14.64, 14.42 and 14.01 ppm by isolates with codes RMB7, RMB4, RMB1, RMA1 and RMA2.

Keywords: *nitrogen fixing bacteria, rhizosphere, AIA hormone*

PENDAHULUAN

Pemerintah Indonesia telah melakukan berbagai upaya untuk dapat menyediakan pangan yang cukup bagi masyarakat salah satunya berupa penambahan luas tanam. Penambahan luas tanam pertanian dapat dilakukan terhadap wilayah yang sebelumnya belum dimanfaatkan. Sasarannya adalah lahan hutan, lahan kering dan bentuk-bentuk lahan marginal (terpinggirkan) lainnya. Saat ini lahan kering menjadi tumpuan besar pemerintah Indonesia untuk meningkatkan produksi padi nasional. Lahan kering adalah wilayah atau lahan yang tidak pernah tergenangi atau digenangi air pada sebagian besar waktu dalam setahun. Tanaman yang hidup pada lahan kering seringkali mendapat berbagai tekanan diantaranya cekaman ke keringan berat, keterbatasan kandungan nutrisi dalam tanah diantaranya unsur N, P, K, pH tanah dan kandungan bahan organik rendah (Mulyaningsih *et al.* 2015). Faktor tersebut menyebabkan lahan kering selama ini tidak bisa dimanfaatkan secara optimal untuk lahan pertanian.

Tanaman Mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) merupakan salah satu tanaman yang dapat tumbuh dengan baik di lahan yang tandus dan kering. Tanaman mimba dapat tumbuh hingga ketinggian 30 meter dengan diameter batang 2-5 meter. Rizosfer tanaman mimba ditempati oleh banyak mikroorganisme, salah satunya adalah bakteri yang memiliki kemampuan menambat nitrogen. (Sukrasno dan Tim Lentera, 2003). Bakteri penambat nitrogen yang tidak berasosiasi dengan perakaran tanaman mimba diharapkan memiliki kemampuan beradaptasi dengan cekaman kekeringan.

Bakteri penambat N_2 mempunyai enzim penambat nitrogen yang dikenal dengan nitrogenase yang bekerja mengkatalisis reaksi perubahan N_2 menjadi amonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-) yaitu bentuk-bentuk nitrogen anorganik yang dapat diserap oleh tanaman. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hala dan Ali (2019) menunjukkan bahwa bakteri *Azotobacter sp* dan *Azospirillum sp* yang diisolasi dari rizosfer tanaman Mimba merupakan bakteri penambat nitrogen karena dapat tumbuh pada medium yang selektif. Bakteri penambat nitrogen dapat dimanfaatkan sebagai inokulum dalam pembuatan pupuk hayati.

Pupuk hayati adalah pupuk yang mengandung mikroba hidup yang dapat meningkatkan kandungan unsur hara pada tanah dan membantu pertumbuhan tanaman. Pupuk hayati ini diharapkan bisa diaplikasikan untuk membantu meningkatkan kesuburan tanah dan pertumbuhan tanaman pada lahan kering (Saraswati *et al.*, 2015). Tanaman selain membutuhkan nitrogen juga membutuhkan hormon untuk pertumbuhannya. Salah satu hormon yang dibutuhkan oleh tumbuhan yaitu Auksin. Hormon auksin pada tumbuhan berfungsi untuk pertumbuhan dan perkembangan seperti pengembangan sel dan pemanjangan akar (A'ini 2013). Bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dari tanaman mimba dan memiliki kemampuan penambatan nitrogen yang baik dan dapat menghasilkan hormon auksin diharapkan dapat menjadi inokulum pupuk hayati yang efektif untuk diaplikasikan pada lahan kering.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian Deskriptif untuk mengetahui karakteristik bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dari rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Juni 2021. Sampel diambil secara *incidental sampling* disekitar wilayah Universitas Hindu Indonesia (UNHi), Denpasar, Bali. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2021 yang bertempat di Laboratorium Biologi Jurusan Biologi FMIPA UNM.

Alat yang digunakan antara lain inkubator, mikroskop, autoklaf, hot plate, cawan petri, pH meter, Laminar Air Flow, shaker dan spektrofotometer. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gram colour strain set, medium NfB, medium LG, medium SNA, reagen Salkowski, NaCl, NAOH, L-tryptophan, AIA sintesis, media MR-VP, Media NA, Media Tryptone Broth, Aquadest, dan Kurva Standar Etilen.

Bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dengan menggunakan medium selektif. Medium Seleksi *Azotobacter* yaitu Medium LG, Medium seleksi *Azospirillum* sp. yaitu NfB (*Nitrogen Free Bromtimol Blue*), Medium pertumbuhan *Actinomyces* sp. yaitu SNA (*Starch Nitrate Agar*). Bakteri penambat nitrogen yang telah tumbuh pada medium selektif masing-masing akan digores pada medium NfB dengan menggunakan metode penggoresan Kuadran. Koloni bakteri akan dimurnikan pada media yang sama dengan menggunakan metode *streak plate*. Kegiatan ini diulang minimal 4 kali sampai didapatkan koloni yang terpisah dan menampakkan morfologi koloni yang seragam baik warna, ukuran maupun bentuknya (Kaburuan *et al.*, 2014). Kemudian ditumbuhkan pada medium NfB semi padat untuk diamati pembentukan pelikelnya yang terletak sekitar 5 mm dari permukaan medium NfB semi padat.

Pengujian Hormon AIA menggunakan medium NB 50 ml lalu ditambahkan L-tryptophan 200 ppm (200 µg/ml). Menginokulasikan isolat terpilih ke dalam medium kemudian kultur diinkubasi dan dishaker dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 26°C atau suhu ruang selama 48 jam. Kultur yang telah diinkubasi diambil sebanyak 5 ml dan disentrifug pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya mengambil supernatan sebanyak 1 ml dan dicampur dengan 2 ml reagen Salkowski. Hasil campuran larutan tersebut didiamkan selama 30 menit dalam ruangan gelap. Pengamatan perubahan warna larutan menjadi pink hingga merah dilakukan untuk uji kualitatif isolat sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Pembuatan kurva standar dimulai dengan melarutkan 0,01 g AIA ke dalam 100 ml aquades (100 ppm). Kemudian membuat larutan standar AIA konsentrasi 1, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 dan 45 ppm. Pada larutan standar masing-masing yang berisi 1 ml ditambahkan 2 ml reagen Salkowski dikocok larutan lalu diinkubasi selama 25 menit. Untuk blanko spektrofotometer menggunakan 1 ml aquadest lalu ditambahkan 2 ml reagen Salkowski dikocok lalu diinkubasi selama 25 menit. Nilai absorbansi terkoreksi merupakan nilai absorbansi larutan standar yang telah dikurangi dengan nilai absorbansi blanko. Kurva standar menyatakan hubungan konsentrasi AIA (X) dan absorbansi terkoreksi (Y) dengan menggunakan persamaan regresi $Y = a + bX$. Karakterisasi bakteri berdasarkan morfologi sel (Pewarnaan Gram), Pengamatan koloni (bentuk, warna, margin, sifat koloni, tekstur) dan pengujian Biokimia (iMViC dan motilitas).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi bakteri rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) yang didapatkan 9 isolat bakteri yang diisolasi dari masing-masing medium selektif. Isolat-isolat bakteri tersebut kemudian diseleksi kembali dengan ditumbuhkan dalam medium selektif NfB semi padat. Berdasarkan hasil penelitian, diantara keseluruhan isolat hanya 5 isolat yang dapat menghasilkan pelikel (cincin putih) pada permukaan medium NfB semi padat. Keseluruhan bakteri penambat nitrogen dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik koloni isolasi bakteri yang positif membentuk pelikel asal rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

Kode Isolat	Karakteristik Koloni					Media
	Bentuk	Elevansi	Tepi	Warna	Tekstur	
RMA1	Bulat	Convex	Rata	Putih Kekuningan	Berlendir	NfB
RMB1	Bulat	Low Convex	Rata	Putih Bening	Berlendir	NfB
RMA2	Bulat	Convex	Rata	Putih Bening	Berlendir	LG
RMB4	Bulat	Low Convex	Rata	Putih Bening	Berlendir	LG
RMB7	Irregular	Flat	Bergelombang	Putih Gading	Berkapur	SNA

Keterangan Isolat : RM = Rizosfer Mimba, A = Sampel Lokasi pertama, B = Sampel Lokasi kedua, 1 = Isolat pertama dst.

Kemampuan Penambat N

Bakteri yang sudah diseleksi kemudian diamati potensi penambat N berdasarkan ketebalan pembentukan pelikel pada medium NfB semi padat yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan penambat N tinggi berdasarkan ketebalan pelikel.

Kode Isolat	Medium	Potensi Penambat N
RMA1	NfB semi padat	+++
RMB1	NfB semi padat	+++
RMA2	NfB semi padat	+++
RMB4	NfB semi padat	++
RMB7	NfB semi padat	++

Uji Bakteri Penghasil Hormon AIA

Uji hormon AIA dilakukan terhadap isolat bakteri penambat nitrogen yang positif dapat menghasilkan pelikel pada uji yang telah dilakukan sebelumnya. Isolat bakteri kemudian di tumbuhkan pada medium NB+tryptophan lalu diujikan dengan metode spektrofotometri yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran konsentrasi AIA pada isolat bakteri penambat nitrogen dari rizosfer tanaman Mimba (*Azadirachta indica*).

Kode Isolat	Konsentrasi AIA (ppm)
RMA1	14,42
RMB1	14,64
RMA2	14,01
RMB4	15,11
RMB7	15,15
Kontrol	0

Karakterisasi Bakteri

1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan 4 reagen pewarna. Keseluruhan pewarnaan isolat terpilih dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik isolat bakteri penambat nitrogen yang dilakukan pengamatan mikroskopik dengan pewarnaan gram

Kode isolat	Bentuk Sel	Gram
RMA1	Basil	Negatif
RMB1	Basil	Negatif
RMA2	Basil	Negatif
RMB4	Basil	Negatif
RMB7	Basil	Positif
<i>Eschericia coli</i> (Kontrol)	Basil	Negatif
<i>Bacillus</i> sp (Kontrol)	Basil	Positif

Pengujian Biokimia

Pengujian biokimia dilakukan dengan menggunakan berbagai macam medium. Data pengujian biokimia dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil karakterisasi isolat bakteri penambat nitrogen secara biokimia

Kode Isolat	Indol	MR	VP	Citrat	Motil
RMA1	-	-	-	-	+
RMB1	-	-	-	+	+
RMA2	-	-	-	-	+
RMB4	-	-	-	+	+
RMB7	-	-	-	-	-

Keterangan : (+) = Hasil Positif, (-) = Hasil Negatif

Isolasi mikroba adalah proses memisahkan mikroba satu dari mikroba lain yang berasal dari campuran berbagai mikroba untuk dapat mempelajari sifat biakan, morfologi dan sifat mikroba lainnya (Puspitasari *et al.*, 2012). Isolasi *Azospirillum* menggunakan media NfB dimana media ini merupakan media seleksi azospirillum hal ini sesuai dengan pernyataan Rasti *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa *Azospirillum* dapat diisolasi dengan menggunakan medium NfB dengan beberapa perlakuan. Isolasi *Azotobacter* dilakukan

dengan menggunakan medium LG hal ini sesuai dengan pernyataan Pathil *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa untuk mengisolasi spesies *Azotobacter* dapat menggunakan medium LG. Sedangkan untuk mengisolasi *Actinomyces* menggunakan media SNA (Soluble Nitrate Agar) sesuai penelitian yang dilakukan Ali dan Rante (2011) yang menggunakan media SNA untuk mengisolasi *Actinomyces*.

Hasil isolasi didapatkan bakteri terduga *Azospirillum* sebanyak 3 isolat, tetapi hanya dua isolat saja yang dapat membentuk pelikel pada permukaan medium NfB semi padat yaitu isolat dengan kode RMA1 dan RMB1 yang memiliki ciri koloni bentuk bulat, tepi rata dan tekstur berlendir sedangkan isolat RMA1 elevansi koloni convex serta warna koloni putih kekuningan. Isolat dengan kode RMB1 elevansi low convex dan warna koloni putih bening.

Isolat terduga *Azotobacter* didapatkan sebanyak 4 isolat dan hanya 2 isolat yang positif menghasilkan pelikel yaitu isolat RMA2 dan RMA4 dengan karakteristik koloni berbentuk bulat, tepi rata, tekstur berlending, berwarna putih bening tetapi berbeda dari segi elevansinya dimana isolat RMA2 convex sedangkan RMA4 elevansinya low convex. Sedangkan untuk isolat terduga *Actinomyces* didapatkan sebanyak 2 isolat tetapi hanya 1 yang positif membentuk pelikel yaitu isolat RMB7 yang bentuk koloninya irregular, elevansi flat, tepi bergelombang, berwarna putih gading serta tekstur berkapur.

Hasil seleksi bakteri dari rizosfer tanaman Mimba ditemukan 5 isolat koloni bakteri yang diduga sebagai bakteri penambat nitrogen. Hal ini dikarenakan isolat ditumbuhkan dalam medium NfB dimana medium ini tidak mengandung unsur nitrogen pada komposisinya sehingga bakteri yang dapat tumbuh dalam medium hanya bakteri yang dapat memfiksasi nitrogen bebas (Santoso *et al.*, 2019). Isolat yang diinokulasikan pada medium NfB ditandai dengan tumbuhnya pelikel putih (cincin putih) pada permukaan medium dan berubahnya pH medium menjadi lebih basa dilihat dari berubahnya warna medium yang semula berwarna hijau menjadi kebiruan hal ini terjadi karena adanya proses alkalinisasi yaitu terjadinya oksidasi pada medium yang mengandung malat (Susilowati *et al.*, 2007). Aktivitas nitrogenase yang baik dilihat dari terbentuknya pelikel pada medium. Hal ini disebabkan di dalam medium tidak ada kelebihan oksigen, laju difusi oksigen sama dengan laju respirasi organisme (Susilowati *et al.*, 2007).

Kemampuan Penambat N

Aktivitas penambat nitrogen adalah kemampuan bakteri dalam menambat menambat nitrogen bebas di udara dan mengubahnya dalam bentuk ammonium sehingga dapat membantu pertumbuhan tanaman. Potensi penambatan nitrogen oleh bakteri dapat diketahui dengan terbentuknya pelikel (cincin putih) pada permukaan medium NfB semi padat. Pelikel yang terletak sekitar 5 mm dari permukaan media semi padat kemudian akan berpindah ke permukaan ketika nitrogen di dalam sel sudah terakumulasi. Hasil penelitian diketahui isolat bakteri dengan kode RMA1, RMB1, dan RMA2 diketahui menghasilkan pelikel yang cukup tebal pada permukaan medium dibandingkan dengan isolat dengan kode RMB4 dan RMB7. Berdasarkan tingkat ketebalan pelikel ini, dapat disimpulkan bahwa ketiga isolat di atas memiliki kemampuan penambatan yang lebih tinggi dibandingkan dua isolat lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Susilowati dan Setyowati (2016) menyatakan bahwa aktivitas nitrogenase mendapatkan hasil tertinggi berbanding lurus dengan tingkat ketebalan pelikel yang dihasilkan isolat bakteri pada media NfB semi padat. Makin tebal pelikel yang dihasilkan oleh isolat, maka makin tinggi juga kemampuan aktivitas nitrogenasenya. Semakin tinggi kemampuan nitrogenase maka jumlah nitrogen yang bisa ditambat oleh bakteri saat berada di

lingkungan akan semakin tinggi pula. Dan didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Tarigan dan Elimasni (2013) dimana kemampuan aktivitas nitrogenase dengan menggunakan metode ARA tertinggi didapatkan dari isolat yang menghasilkan pelikel yang tebal di permukaan medium.

Uji Bakteri Penghasil Hormon AIA

Indole-3-Acetic Acid (AIA) adalah salah satu hormon yang berfungsi untuk memacu pertumbuhan sepanjang sumbu longitudinal. Hormon ini dapat meningkatkan pembesaran sel yang berlangsung ke segala arah secara isodiametric, auksin juga berperan dalam pembelahan dan pembentangan sel.

Hasil produksi hormon AIA yaitu isolat RMA1 sebesar 14,42 ppm. Isolat RMB1 sebesar 14,64 ppm. Isolat RMA2 menghasilkan konsentrasi sebesar 15,11 ppm. Isolat bakteri dengan kode RMB7 memiliki konsentrasi AIA tertinggi diantara isolat yang lain sebesar 15.15 ppm. Sedangkan konsentrasi terendah yaitu 14.01 ppm isolat RMB4 dengan masa inkubasi yang sama selama 48 jam. Waktu inkubasi terbaik untuk perhitungan hormon AIA yaitu inkubasi selama 48 jam sampai 72 jam pada saat bakteri memasuki fase stasioner. Produksi AIA akan meningkat pada saat kondisi pertumbuhan menurun, ketersediaan karbon yang terbatas dan dalam kondisi lingkungan pH asam. Kondisi tersebut terjadi pada saat bakteri memasuki fase stasioner (Dewi, 2015).

Biosintesis AIA oleh bakteri, dapat ditingkatkan dengan penambahan L-tryptofan sebagai prekursor ke dalam media tumbuh bakteri (Chaiharn dan Lumyong, 2011). Konsentrasi penambahan tryptophan sebagai prekursor sintesis auksin juga berpengaruh terhadap jumlah nitrogen total dan produksi auksin. Pada penelitian ini analisis dilakukan menggunakan L-tryptophan sebanyak 200 ppm. Hasil penelitian didapatkan hormon AIA tertinggi yaitu 15,15 ppm oleh isolat RMB7. Konsentrasi AIA dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian yang dilakukan A'ini (2013) yang menghasilkan AIA terbesar oleh isolat A4.01 yaitu 9,9 ppm. Penelitian Widawati dan Suliasih (2019) menghasilkan AIA sebesar 0,46 ppm untuk isolat *Azopirillum* sp, konsentrasi 0,33 ppm untuk *Azotobacter chroococcum*, dan isolat *Azotobacter paspalii* sebesar 3,99 ppm dengan waktu inkubasi yang sama selama 48 jam dan pemberian L-tryptophan 200 ppm. Tetapi lebih rendah dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Sukmadewi *et al.* (2015) yang menghasilkan hormon AIA tertinggi yaitu 32,84 ppm dengan konsentrasi L-tryptophan 200 ppm. Menurut Danapriatna (2014) semakin tinggi konsentrasi tryptophan yang di berikan semakin tinggi juga hasil produksi AIA. Dapat dilihat pada penelitian yang dilakukan oleh Anggraini *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa produksi hormon AIA dengan penambahan tryptophan sebesar 500 ppm menghasilkan AIA sebesar 37,70 ppm pada hari inkubasi 5 hari. Sedangkan penelitian yang dilakukan Hartono *et all* (2016) dengan penambahan tryptophan 1000 ppm menghasilkan AIA tertinggi sebesar 41,3 ppm dengan masa inkubasi selama 6 hari.

Karakterisasi Bakteri

1. Isolat RMA1

Isolat RMA1 berdasarkan hasil pewarnaan gram diketahui merupakan bakteri gram negatif. Pengujian Biokimia isolate RMA1 untuk tidak memiliki enzim triptofanase sehingga negatif uji indol, tidak dapat memfermentasikan metil glikon dan glukosa pada uji MR-VP serta tidak dapat menggunakan citrate sebagai sumber karbon dan bersifat positif pada uji motilitas yang artinya isolate ini memiliki alat gerak. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa bakteri *Azospirillum* sp. negatif uji Indol, MR-VP, dan

beberapa jenis negatif uji Citrat dan bersifat motil (Santoso *et al.* 2019 ; Usha dan Kanimozhi 2011 ; dan Pedraza *et al.* 2020).

2. Isolat RMB1

Isolat RMB1 hasil pewarnaan gram merupakan bakteri gram negatif. Isolate ini memiliki ciri fisiologis negatif untuk uji ndol, MR-VP dan positif pada uji citrate dan motil hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa *Azospirillum* sp. negatif uji Indol, MR-VP, dan beberapa jenis positif uji Citrat dan bersifat motil (Santoso *et al.* 2019 ; Usha dan Kanimozhi 2011 ; dan Pedraza *et al.* 2020).

3. Isolat RMA2

Isolat RMA2 hasil pewarnaan gramnya merupakan bakteri gram negatif. Berdasarkan pengujian Biokimia isolat RMA2 bersifat negatif uji Indol, MR-VP, Citrat dan positif uji motil. Hasil pengujian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa bakteri *Azotobacter* sp. bersifat negatif untuk uji Indol, MR-VP, citrate dan positif memiliki alat gerak (Santoso *et al.* 2019 ; Painkra *et al.* 2019 ; Naz *et al.* 2012 ; Samal *et al.* 2020 dan Patil *et al.* 2020).

4. Isolat RMB4

Isolat RMB4 berdasarkan hasil pewarnaan gram merupakan bakteri gram negatif. Isolate ini memiliki ciri fisiologis negatif untuk uji ndol, uji MR-VP dan positif uji citrate dan motil hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa bakteri *Azotobacter* sp. negatif uji Indol, MR-VP, dan beberapa jenis positif uji Citrat dan bersifat motil (Santoso *et al.* 2019 ; Painkra *et al.* 2019 ; Naz *et al.* 2012 ; Samal *et al.*, 2020) dan Patil *et al.* 2020).

5. Isolat RMB7

Isolat RMB4 merupakan bakteri gram positif berbentuk basil. Isolat ini memiliki ciri fisiologis negatif untuk semua uji yaitu Indol, uji MR-VP dan citrate dan motil hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa bakteri *Actinomyces* sp. memiliki ciri-ciri yaitu bersifat negatif untuk uji yaitu Indol, uji MR-VP, citrate, gas, H₂S dan nonmotil sedangkan positif uji katalase, oksidasi, urease dan hydrogen sulfide (Lestari *et al.* 2019) ; Gopalakrishnan *et al.* 2020) ; Kathiravan *et al.* 2016).

KESIMPULAN

Bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dari rizosfer tanaman memiliki kemampuan penambatan nitrogen yang baik tetapi memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk pembentukan pelikel serta menghasilkan hormon AIA yang tinggi berkisar 14,01 hingga 15,15 ppm. Berdasarkan hasil penelitian diketahui isolate dengan kode RMB1 menghasilkan pelikel yang tebal dibandingkan isolate yang lain dan juga menghasilkan hormon AIA yang cukup tinggi sehingga diharapkan ketika isolate bakteri ini digunakan sebagai inokulum pupuk hayati dapat membantu pertumbuhan tanaman pada lahan kering.

DAFTAR PUSTAKA

Agisti, A., Alami, N.H., dan Hidayati, T.N. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik pada Lahan Restorasi dengan Metode Legume Cover Crop (LCC) di Daerah Pasirian Lumajang Jawa Timur. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 3(2) : E36-E39.

- A'ini, Z.F. 2013. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Iaa (Indole-3-Acetic Acid) Dari Tanah Dan Air Di Situgunung, Sukabumi. *Faktor Exacta* 6(3): 231-240.
- Ali, A dan Rante, H. 2011. Karakterisasi Mikrobial Rizosfer asal Tanaman Ginseng Jawa (*Talinum triangulare*) berdasarkan Gen Ribosomal 16S rRNA dan 18S rRNA. *Jurnal Biologi Papua* 3(2) : 74–81.
- Anggraini, Y.P., Linda, T.M dan Lestari, W. 2018. Seleksi Aktinomisetes dalam Menghasilkan Indole Acetic Acid dan Efektivitas Terhadap Perkecambahan Benih Cabai Merah (*Capsicum annum L.*). *Biospecies* 11(2) : 115 – 122.
- Chaiharn, M dan Lumyong, S. 2011. Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. *Curr Microbiol* 62:173–181.
- Dewi , T.K., Arum, E.S., Imamuddin, H dan Antonius, S. 2015. Karakterisasi Mikroba Perakaran (PGPR) Agen Penting Pendukung Pupuk Organik Hayati. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 1(2) : 289-295.
- Danapriatna, N. 2014. *Faktor Yang Mempengaruhi Biosintesis AIA Oleh Azospirillum*. *Jurnal Ilmiah Solusi* 1(2) : 82-88.
- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V dan Prasanna S.L. 2020. *Chapter 5 Streptomyces : Beneficial Microbes In Agro-Ecology Bacteria And Fungi*. Cambridge : Academia Press.
- Hala, Y dan Ali, A. 2019. Isolation and Characterization of Azotobacter from Neems Rhizosphere. *Journal of Physics: Conf. Series* 1244 (2019) 012019 : 1-5.
- Hartono ; Nurfitriani ; Asnawati, F ; Citra, H ; Handayani, N.I ; Junda, M ; Ali, A ; Hala, Y dan Jumadi, O. 2016. Ability Of Ammonium Excretion, Indol Acetic Acid Production, And Phosphate Solubilization Of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated From Crop Rhizosphere And Their Effect On Plant Growth. *Arpn. Journal Of Engineering And Applied Sciences* 11(19) : 11735-11741.
- Kathiravan, P., Sabarinathan, R., Subaiyya, R dan Selvam, M.M. 2016. Investigation On Sugar Cane Field Actinomycetes Of Erode District. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 7 (3) : 1145-1154.
- Kaburuan, R., Hapsoh dan Gusmawartati. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Non-Simbiotik Tanah Gambut Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu. *Jurnal Agroteknologi* 5(1) : 35-39.
- Lestari, P., Susilowati, D.N dan Riyanti, E.I. 2007. Pengaruh Hormon Asam Indol Asetat yang Dihasilkan Azospirillum sp. Terhadap Perkembangan Akar Padi. *Jurnal AgroBiogen* 3(2) : 66-72.
- Mulyaningsih, E.S ; Sukiman, H ; Ermayanti, T.M ; Lekatompessy, Sylvia ; Indrayani, S ; Seri, A.R dan Aldi, E.B.M. 2015. Respon Padi Gogo Terhadap Pupuk Hayati Di Lahan Kering Kabupaten Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara. *Jurnal Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian*. 218(3) : 251-262.
- Naz, I., Bano, A., Rehman, B., Pervaiz, S., Iqbal, M., Sarwar, A dan Yasmin, F. 2012. Potential of Azotobacter vinelandii Khsr1 as bioinoculant. *African Journal of Biotechnology* 11(45) : 10368-10372.

- Pedraza, R.O., Filippone, M.P., Fontana, C., Salazar, S.M., Ramirez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., dan Baca, B.E. 2020. *Azospirillum : Beneficial Microbes in Agro-Ecology, First Edition*. Cambridge : Academic Press.
- Painkra, H., Cowdhury, T dan Verma, N.O. 2019. Characterization And Screening Of Native Isolats Of PSB And Azotobacter Under In Vitro Conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* ISSN 8 (05) : 2319-7706.
- Puspitasari, F.D., Shovitri, M dan Kuswytasari, N.D. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Proteolitik dari Tangkai Septik. *Jurnal Sains dan Seni*. 1(1) : E1-E4.
- Pathil, S.V., MohiteB.V., Patil, C.D., Koli, S.H., Borase, H.P., Patil, V.S. 2020. *Azotobacter : Beneficial Microbes in Agro-Ecology, First Edition*. Cambridge : Academic Press.
- Sukrasno dan Tim Lentera. 2003. *Mimba Tanaman Obat Multifungsi*. Tangerang : PT.Agromedia Pustaka.
- Santoso, K., Rahmawati dan Rafdinal. 2019. Eksplorasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Tanah Hutan Mangrove Sungai Peniti, Kabupaten Mempawah. *Jurnal Protobiont* 8 (1) : 52 – 58.
- Susilowati, D.M., Saraswati, R., Hastuti, R.D dan Yuniarti, E. 2007. Peningkatan Serapan N pada Kedelai yang Diinokulasikan Bakteri Diazotrof Endofit di Medium Vermiculit. *Jurnal Tanah dan Iklim* 26 : 41-46.
- Susilowati, D.M dan Setyowati, M. 2016. Analisis aktivitas nitrogenase dan gen nifH isolat bakteri rhizosfer tanaman padi dari lahan sawah pesisir jawa barat. *Al-kauniyah: Journal of Biology* 9(2) : 126-138.
- Samal, D.P.K., Ray, P., Sukla, L.B dan Shukla, V. Isolation and screening of Azotobacter Spp. for plant growth promoting properties and its survival under different environmental stress conditions. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 10 (2) : 5188 – 5192.
- Saraswati, R., Hastuti,R.D dan Salma,S. 2015. *Potensi Pupuk hayati Pada Pertanian Organik : Sistem Pertanian Organik Mendukung Produktivitas Lahan Berkelanjutan*. Jakarta : AIARD Press.
- Sukmadewi, D.K., Suharjono dan Antonius, S. 2015. Uji Potensi Bakteri Penghasil Hormon AIA (Indole Acetic Acid) dari Tanah Rhizosfer Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.). *Jurnal Biotropika*. 3 (2) : 91-94.
- Usha, D.K dan Kanimozhi, K. 2011. Isolation and characterization of saline tolerant Azospirillum strains from paddy field of Thanjavur district. *Advances in Applied Science Research* 2 (3): 239-245.
- Widawati, S dan Suliasih. 2019. Role of Indigenous Nitroge-fixing Bacteria in Promoting Plant Growth on Post Tin Mining Soil. *Makara Journal of Science* 23(1) : 28-28.